

09/068-28

6

PCT/JP97/03226

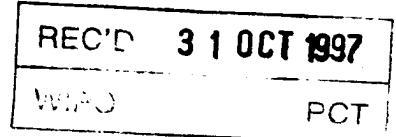
日 本 国 特 許 庁 12.09.97  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1996年10月28日



出 願 番 号  
Application Number:

平成 8年特許願第285066号

出 願 人  
Applicant (s):

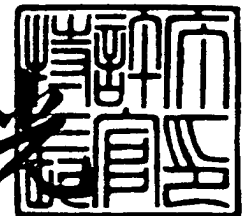
協和醗酵工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年10月17日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井 寿



出証番号 出証特平09-3084279

【書類名】 特許願

【整理番号】 H08-1471N2

【提出日】 平成 8年10月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 19/30

【発明の名称】 糖ヌクレオチド類および複合糖質の製造法

【請求項の数】 35

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都町田市中町 3-9-10

    【氏名】 小泉 聡司

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都町田市本町田 1171-3-201

    【氏名】 佐々木 克敏

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都町田市森野 4-17-17

    【氏名】 遠藤 徹夫

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都町田市中町 3-9-13

    【氏名】 尾崎 明夫

【特許出願人】

    【識別番号】 000001029

    【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

    【代表者】 平田 正

【先の出願に基づく優先権主張】

    【出願番号】 平成 8年特許願第244451号

    【出願日】 平成 8年 9月17日

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 008187

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	要約書	1
【物件名】	図面	1
【ブルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖ヌクレオチド類および複合糖質の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヌクレオチドの前駆物質からウリジン-5'-三リン酸（以下、UTPと略す）を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、糖とUTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、および糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞の培養液または該培養液の処理物とを酵素源として用い、該酵素源、ヌクレオチドの前駆物質、糖および複合糖質前駆体を含む水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法。

【請求項2】 ヌクレオチドの前駆物質からUTPを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、および糖とUTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源として用い、該酵素源、ヌクレオチドの前駆物質および糖を含む水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に糖ヌクレオチドを生成蓄積させ、該水性媒体中から糖ヌクレオチドを採取することを特徴とする糖ヌクレオチドの製造法。

【請求項3】 糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、複合糖質前駆体および請求項2記載の製造法により得られた糖ヌクレオチドを含有する水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法。

【請求項4】 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる細胞、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分画物、該細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品であることを特徴とする、請求

項1、2または3記載の製造法。

【請求項5】 ヌクレオチドの前駆物質が、オロット酸、ウラシル、オロチジンまたはウリジンである、請求項1または2記載の製造法。

【請求項6】 糖ヌクレオチドが、ウリジンニリン酸化合物である、請求項1、2または3記載の製造法。

【請求項7】 ウリジンニリン酸化合物が、ウリジンニリン酸グルコース（以下、UDP-Glcと略す）、ウリジンニリン酸ガラクトース（以下、UDP-Galと略す）、ウリジンニリン酸-N-アセチルグルコサミン（以下、UDP-GlcNAcと略す）およびウリジンニリン酸-N-アセチルガラクトサミン（以下、UDP-GalNAcと略す）から選ばれるウリジンニリン酸化合物である、請求項5記載の製造法。

【請求項8】 糖が、グルコース、ガラクトース、グルコサミン、グルコサミン-1-リン酸、グルコサミン-6-リン酸、N-アセチルグルコサミンおよびN-アセチルガラクトサミンから選ばれる糖である、請求項1または2記載の製造法。

【請求項9】 複合糖質が、グルコース含有複合糖質、グルコサミン含有複合糖質、ガラクトース含有複合糖質、ガラクトサミン含有複合糖質、マンノース含有複合糖質、フコース含有複合糖質およびノイラミン酸含有複合糖質から選ばれる複合糖質である、請求項1または3記載の方法。

【請求項10】 ガラクトース含有複合糖質が、ラクト-N-テトラオース（以下、LNTと略す）、ラクト-N-ネオテトラオース（以下、LNnTと略す）およびN-アセチルラクトサミンから選ばれるガラクトース含有複合糖質である、請求項9記載の製造法。

【請求項11】 複合糖質前駆体が、糖、オリゴサッカライド、蛋白質、ペプチド、糖蛋白質、糖脂質およびグリコペプチドから選ばれる複合糖質前駆体である、請求項1または3記載の製造法。

【請求項12】 複合糖質前駆体が、N-アセチルグルコサミンおよびGlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glcから選ばれる複合糖質前駆体である、請求項11記載の製造法。

【請求項13】ヌクレオチドの前駆物質からUTPを生産する能力を有する微生物が、コリネバクテリウム属に属する微生物であることを特徴とする、請求項1または2記載の製造法。

【請求項14】コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21170であることを特徴とする請求項13記載の製造法。

【請求項15】糖とUTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物がエシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物であることを特徴とする、請求項1または2記載の製造法。

【請求項16】エシェリヒア属に属する微生物がエシェリヒア・コリであることを特徴とする、請求項15記載の製造法。

【請求項17】エシェリヒア・コリが、ウリジン二リン酸グルコースピロフォスホリラーゼ（以下、galUと略す）をコードする遺伝子およびピロフォスファターゼ（以下、ppaと略す）をコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有するエシェリヒア・コリであることを特徴とする、請求項16記載の製造法。

【請求項18】ウリジン二リン酸グルコースピロフォスホリラーゼをコードする遺伝子およびピロフォスファターゼをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来であることを特徴とする、請求項17記載の製造法。

【請求項19】エシェリヒア・コリが、エシェリヒア・コリMP347/pNT12であることを特徴とする、請求項18記載の製造法。

【請求項20】糖とUTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、2種類以上の微生物より構成されることを特徴とする、請求項1または2記載の製造法。

【請求項21】微生物が、ガラクトキナーゼ（以下、galKと略す）をコードする遺伝子およびガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ（以下、galTと略す）をコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物、およびgalUをコードする遺伝子およびppaをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有

する微生物から構成されることを特徴とする、請求項20記載の製造法。

【請求項22】 galKをコードする遺伝子、galTをコードする遺伝子、galUをコードする遺伝子およびppaをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来であることを特徴とする請求項21記載の製造法。

【請求項23】 微生物が、エシェリヒア属に属する微生物であることを特徴とする、請求項21記載の製造法。

【請求項24】 エシェリヒア属に属する微生物が、エシェリヒア・コリMP347/pNT25およびエシェリヒア・コリMP347/pNT12であることを特徴とする請求項23記載の製造法。

【請求項25】 微生物が、ホスホグルコムターゼ（以下、pgmと略す）をコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物、ホスホグルコサミンムターゼ（以下、glmMと略す）をコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物、アセテートキナーゼ（以下、ackAと略す）をコードする遺伝子およびホスホトランスアセチラーゼ（以下、ptaと略す）をコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物、およびUDP-GlcNAcピロフォスホリラーゼ（以下、glmUと略す）をコードする遺伝子およびppaをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物から構成されることを特徴とする請求項20記載の製造法。

【請求項26】 glmMをコードする遺伝子、pgmをコードする遺伝子、glmUをコードする遺伝子、ppaをコードする遺伝子、ackAをコードする遺伝子およびptaをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来であることを特徴とする、請求項25記載の製造法。

【請求項27】 微生物が、エシェリヒア属に属する微生物であることを特徴とする、請求項25記載の製造法。

【請求項28】 エシェリヒア属に属する微生物が、エシェリヒア・コリMP347/pNT14、エシェリヒア・コリMP347/pNT24、エシェリヒア・コリMP347/pNT26およびエシェリヒア・コリMP347/pNT31であることを特徴とする、請求項27記載の製造法。

【請求項29】 水性媒体に酢酸およびコエンザイムAを添加し反応させることを特徴とする請求項1または2記載の製造法。

【請求項30】 水性媒体に酢酸およびパントテン酸を添加し反応させることを特徴とする請求項1または2記載の製造法。

【請求項31】 糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する微生物が、Escherichia coliまたはSaccharomyces cerevisiaeであることを特徴とする請求項1または3記載の製造法。

【請求項32】 糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する動物細胞がナマルバKJM-1細胞であることを特徴とする請求項1または3記載の製造法。

【請求項33】 動物細胞が、 $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する動物細胞であることを特徴とする、請求項32記載の製造法。

【請求項34】  $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子がヒト・メラノーマ細胞由来であることを特徴とする、請求項33記載の製造法。

【請求項35】 動物細胞が、ナマルバKJM-1/pAMoERSAW1であることを特徴とする、請求項33記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細菌・ウイルス等の感染防御、心血管障害への適応および免疫治療に有用な複合糖質および該複合糖質の合成基質として重要である糖ヌクレオチドの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

糖ヌクレオチドの製造方法として、1) 化学合成法 [Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 28, 307(1973)、Bull. Chem. Soc. Japan, 46, 3275-3277(1973)、J. Org. Chem., 57, 146-151(1992)]、2) 酵素を用いた製造方法 [J. Org. Chem.,



55, 1834-1841(1992)、J. Org. Chem., 57, 152-157(1992)、特表平7-508413]、3) 酵母等の微生物菌体を用いる方法(特公昭46-40756、特公昭47-1837、特公昭47-26703、特公昭49-8278)、4) 耐塩性酵母の微生物菌体からの抽出法(特開平8-23993)などが知られている。

【0003】

1)の方法においては、高価なウリジン-5'-リン酸(以下、UMPと略す)のモルフォリデート誘導体や糖リン酸などが必要であり、2)の方法においては、UMP、ウリジン-5'-二リン酸(以下、UDPと略す)、ウリジン-5'-三リン酸(以下、UTPと略す)、アデノシン-5'-三リン酸(以下、ATPと略す)やホスホエノールピルビン酸、糖リン酸などの高価な原料やピルベートキナーゼなど多数の酵素が必要であり、3)の方法においては酵母菌体の乾燥処理を必要としたり、原料として高価なUMPなどが用いられている。4)の方法を含め、上記いずれの方法においても、原料として高価なウリジンヌクレオチドや糖リン酸などが用いられていたり、操作的に大量生産が困難であるため、今日に至るまで、糖ヌクレオチドの工業的規模での製造法は確立されていない。

【0004】

複合糖質の製造法としては、1)化学合成法[Method in Enzymol., 247, 193-211(1994)]、2)加水分解酵素[Anal. Biochem., 202, 215-238(1992)]を用いる方法、および3)糖転移酵素(特開平7-79792、特表平7-500248、特公平5-82200)を利用した方法が知られている。

1)の方法では立体選択的合成のためには保護基の導入が必須であり、2)の方法では収率・選択性が十分でなく、3)の方法においては高価な原料が必要であり、いずれの方法においても複合糖質の工業的な製造方法は確立されていない。

【0005】

コリネバクテリウム属に属する微生物において、オロット酸を添加することにより、UMPが生産されるとの報告がある[Amino Acid, Nucleic Acid, 23, 107(1971)]。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、細菌・ウィルス等の感染防御、心血管障害への適応および免疫治療に有用な複合糖質および該複合糖質の合成基質として重要である糖ヌクレオチドの安価で効率的な製造方法を提供することにある。

本発明者らは、微生物を用いて、ヌクレオチドの前駆体を原料とした複合糖質および糖ヌクレオチドの生産について鋭意検討を行った結果、培地にヌクレオチドの前駆物質および糖を添加することにより糖ヌクレオチドが生産できること、糖ヌクレオチドの生成に関与する遺伝子の発現を強化することにより、その生産性が向上することを見だし、更に、該糖ヌクレオチドを生産可能な微生物、および、糖ヌクレオチドおよび複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞を利用し複合糖質を生産できることを見だし本発明を完成するに至った。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、ヌクレオチドの前駆物質からUTPを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、および糖とUTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ヌクレオチドの前駆物質および糖を含む水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に糖ヌクレオチドを生成蓄積させ、該水性媒体中から糖ヌクレオチドを採取することを特徴とする糖ヌクレオチドの製造法、およびヌクレオチドの前駆物質からUTPを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、糖とUTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、および糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ヌクレオチドの前駆物質、糖および複合糖質前駆体を含む水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法を提供する。

第1表に本発明に用いる略号および該略号の説明を記す。

【0008】

【表1】

第 1 表

Glc	グルコース
G-6-P	グルコース-6-リン酸
G-1-P	グルコース-1-リン酸
Gal	ガラクトース
Gal-1-P	ガラクトース-1-リン酸
GlcN-6-P	グルコサミン-6-リン酸
GlcN-1-P	グルコサミン-1-リン酸
GlcNAc-1-P	N-アセチルグルコサミン-1-リン酸
OMP	オロチジン-5'-リン酸
PRPP	ホスホリボシルピロリン酸
アセチル-CoA	アセチルコエンザイムA
CoA	コエンザイムA
UTP	ウリジン-5'-三リン酸
UDP	ウリジン-5'-二リン酸
UMP	ウリジン-5'-一リン酸
ATP	アデノシン-5'-三リン酸
ADP	アデノシン-5'-二リン酸
AMP	アデノシン-5'-一リン酸
UDP-Glc	ウリジン二リン酸グルコース
UDP-Gal	ウリジン二リン酸ガラクトース
UDP-GlcNAc	ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン
UDP-GalNAc	ウリジン二リン酸-N-アセチルガラクトサミン
LNT	ラクト-N-テトラオース
LNnT	ラクト-N-ネオテトラオース
pgm	ホスホグルコムターゼ
galU	UDP-Glcピロホスホリラーゼ
ppa	ピロフォスファターゼ
galK	ガラクトキナーゼ
galT	ガラクトース-1-リン酸 ウリジルトランスフェラーゼ
glmM	ホスホグルコサミンムターゼ
glmU	UDP-GlcNAcピロフォスホリラーゼ
ackA	アセテートキナーゼ
pta	ホスホトランスアセチラーゼ
acs	アセチルコエンザイムAシンセターゼ

本発明によれば、1) ウリジンヌクレオチドや糖リン酸などの高価な原料を必要とせず、オロット酸等の安価なヌクレオチドの前駆物質および糖を原料として利用することができる、2) UDPからUTPへの転換において高価なホスホエノールピルビン酸とピルベートキナーゼの添加を必要としない、更に、3) 酵素

の単離操作を必要としない等の特徴を有する糖ヌクレオチドの新規な製造法および該糖ヌクレオチド製造法を利用した新規な複合糖質の製造法を提供できる。

以下に本発明を詳細に説明する。

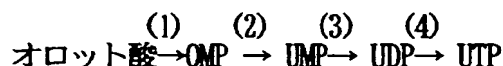
【0009】

【発明の実施の形態】

1) 本発明で用いられるヌクレオチドの前駆物質からUTPを生産する能力を有する微生物としては、ヌクレオチドの前駆物質からUTPを生産する能力を有する微生物であればいずれも用いることができ、例えば、化1に示した(1)から(4)の酵素における活性の強い微生物をあげることができる。

【0010】

【化1】



- (1) : オロテートホスホリボシルトランスフェラーゼ(EC 2.4.2.10)
- (2) : OMPデカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.23)
- (3) : ヌクレオシドモノホスフェートキナーゼ(EC 2.7.4.4)
- (4) : ヌクレオシドジホスフェートキナーゼ(EC 2.7.4.6)

好ましい微生物として、化1に示した(1)から(4)の酵素活性が強く、且つ、PRPP供給能力およびATP再生能力の強い微生物をあげることができる。

具体的には、コリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としてはコリネバクテリウム・アンモニアゲネスをあげることができる。更に好ましくはコリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21170をあげることができる。

また、(1)、(2)、(3)および(4)から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。

【0011】

2) 本発明で用いられる糖とUTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物としては、UTPに糖を転移し、目的とする糖ヌクレオチドを生成する活性を有する微生物であればいずれでも用いることができ、例えば、

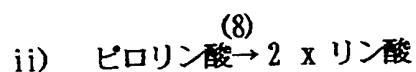
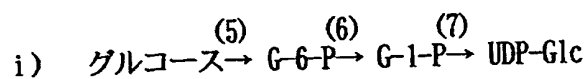
2) -① UDP-Glcの生産に関しては、下記、化2に示した(5)から(8)の酵素における活性の強い微生物を、

2) -② UDP-Galの生産に関しては、下記、化3に示した(9)から(10)の酵素における活性の強い微生物を、また、好ましくは、下記、化2に示した(5)から(8)の酵素活性の強い性質をもあわせ持つような微生物を、

2) -③ UDP-GlcNAcの生産に関しては、下記、化4に示した(11)から(17)の酵素における活性の強い微生物等をあげることができる。

【0012】

【化2】



(5) : ヘキソキナーゼ (EC 2.7.1.1)  
あるいはグルコキナーゼ (EC 2.7.1.2)

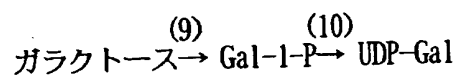
(6) : ホスホグルコムターゼ (EC 2.7.5.1)

(7) : UDP-Glcピロホスホリラーゼ (EC 2.7.7.9)

(8) : (イノーガニック) ピロフォスファターゼ (EC 3.6.1.1)

【0013】

【化3】

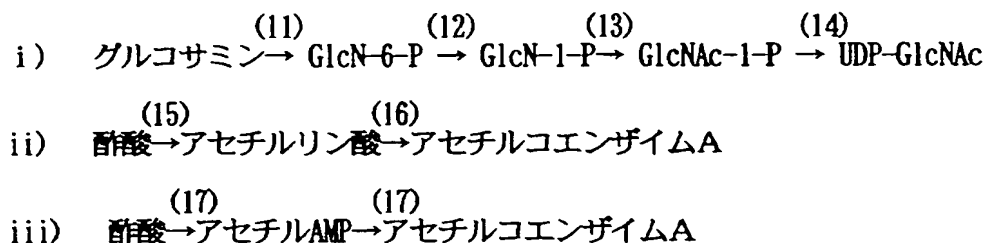


(9) : ガラクトキナーゼ (EC 2.7.1.6)

(10) : ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ  
(EC 2.7.7.10)

【0014】

【化4】



- (11) : ヘキソキナーゼあるいはグルコキナーゼ (EC 2.7.1.2)  
 (12) : ホスホグルコサミンムターゼ  
 (13) : グルコサミン-1-リン酸アセチルトランスフェラーゼ  
 (14) : UDP-GlcNAcピロホスホリラーゼ (EC 2.7.7.23)  
 (15) : アセテートキナーゼ (EC 2.7.2.1)  
 (16) : ホスホトランスアセチラーゼ (EC 2.3.1.8)  
 (17) : アセチルコエンザイムAシンセターゼ (EC 6.2.1.1)

上記2) - ①に記載の微生物の好ましい例として、上記化2に記載の(5)から(8)の酵素における強い活性を持ち、且つ、PRPP供給能力、ATP再生能力の強い微生物をあげることができる。

具体的には、エシェリヒア属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としては、エシェリヒア・コリをあげることができる。

【0015】

また、(5)、(6)、(7)および(8)から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来のgalUおよびppa遺伝子を含む組換え体DNA (pNT12)を保有する大腸菌MP347株 (FERM BP-408)、エシェリヒア・コリ由来のpgm遺伝子を含む組換え体DNA (pNT24)を保有する大腸菌MP347株等をあげることができる。

上記2) - ②に記載の微生物の好ましい例として、上記化2に記載の(5)から(8)の酵素における強い活性、および化3に記載の(9)から(10)の酵素における強い活性を持ち、且つ、PRPP供給能力、ATP再生能力の強い微生物をあげることができる。

【0016】

具体的には、エシェリヒア属に属する微生物をあげることができ、好ましい具

体例としては、エシェリヒア・コリをあげることができる。

また、(9) および (10) から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来の *galT* および *galK* 遺伝子を含む組換え体 DNA (pNT25) を保有する大腸菌 MP347 株が挙げられる。

【0017】

上記 2) -③に記載の微生物の好ましい例として、化 4 に記載の (11) から (17) の酵素における強い活性を持ち、且つ、PRPP 供給能力、ATP 再生能力の強い微生物をあげることができる。また、更に、pgm 活性の強い微生物も好ましい例としてあげることができる。

具体的には、エシェリヒア属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としては、エシェリヒア・コリをあげることができる。

【0018】

また、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16) および (17) から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来の *glmM* 遺伝子を含む組換え体 DNA (pNT31) を保有する大腸菌 MP347 株、エシェリヒア・コリ由来の *glmU* および *ppa* 遺伝子を含む組換え体 DNA (pNT14) を保有する大腸菌 MP347 株、エシェリヒア・コリ由来の *ackA* および *pta* 遺伝子を含む組換え体 DNA (pNT26) を保有する大腸菌 MP347 株等をあげることができる。

【0019】

微生物が 1) に記載の微生物の性質および 2) に記載の微生物の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、ヌクレオチドの前駆物質と糖より糖ヌクレオチドを生産することが可能である。

微生物が 1) に記載の微生物の性質および 2) -①に記載の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、オロット酸等のヌクレオチド前駆体と Glc より UDP-Glc を、1) に記載の微生物、2) -①に記載の微生物および 2) -②に記載の微生物の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、オロッ

ト酸等のヌクレオチド前駆体とGalよりUDP-Galを、1)に記載の微生物の性質および2)-③に記載の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、オロット酸等のヌクレオチド前駆体とグルコサミンよりUDP-GlcNAcを生産することが可能である。

【0020】

また、上記の菌株とは異なり、1菌株中に糖ヌクレオチドの製造に必要な活性の一部しか有していない微生物の場合、それぞれの活性を有する微生物を適宜組み合わせ、糖ヌクレオチドの製造を行うことができる。例えば、1)に記載の性質を有する微生物および2)-①に記載の性質を有する微生物の2種類の微生物を用い、オロット酸等のヌクレオチド前駆体とGlcよりUDP-Glcを、1)に記載の性質を有する微生物、2)-①に記載の性質を有する微生物および2)-②に記載の性質を有する微生物の3種類の微生物を用い、オロット酸とGalよりUDP-Galを、1)に記載の性質を有する微生物および2)-③の2種類の微生物を用い、オロット酸とグルコサミンよりUDP-GlcNAcを生産することが可能である。

【0021】

更に、1)に記載の性質を有する微生物も1種類である必要はなく、2種類以上で1)に記載する性質を構成する場合にも1)に記載の性質を有する微生物として利用でき、同様に2)に記載の性質を有する微生物も1種類である必要はなく、2種類以上で構成することができる。該微生物群を適宜組み合わせることにより、目的とする糖ヌクレオチドを生産することができる。

【0022】

上述のように、糖ヌクレオチドの製造において、形質転換体を利用することが可能であるが、該製造に関与する、第2表に記載した遺伝子は、大腸菌の染色体よりクローン化され、その全塩基配列が決定されている。

【0023】



【表2】

第 2 表

遺伝子	参考文献
galU遺伝子	J. Biochem., 115, 965-972(1994)
ppa遺伝子	J. Bacteriol., 170, 5901-5907(1988)
galT遺伝子	Nucleic Acids Res., 14, 7705-7711(1986)
galK遺伝子	Nucleic Acids Res., 13, 1841-1853(1985)
glmM遺伝子	J. Biol. Chem., 271, 32-39(1996)
pgm遺伝子	J. Bacteriol., 176, 5847-5851(1994)
glmU遺伝子	J. Bacteriol., 175, 6150-6157(1993)
ackA遺伝子	J. Bacteriol., 171, 577-580(1989)
pta遺伝子	J. Biochem., 116, 916-922(1994)
acs遺伝子	J. Bacteriol., 177, 2878-2886(1995)

該遺伝子を含有するプラスミドを保有する大腸菌からのプラスミドDNAの単離精製、プラスミドDNAの制限酵素による切断、切断したDNA断片の単離精製、DNA断片の酵素的結合、組換え体DNAを用いた大腸菌の形質転換等、遺伝子組換えに関する種々の操作は公知の方法〔例えばJ. Sambrook らの成書; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second edition Cold Spring Harbor Laboratory(1989)〕に準じて行うことができる。また、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション（以下、PCRと略す）はパーキン・エルマー・シータス社製のサーマル・サイクラー等を用いて行うことができる。

## 【0024】

糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子を宿主中で発現させるためには、該遺伝子を含むDNA断片を、制限酵素類あるいはPCRで、該遺伝子を含む適当な長さのDNA断片とした後に、発現ベクター中プロモーターの下流に挿入し、次いで上記DNAを挿入した発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主中に導入することにより達成できる。

## 【0025】

宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものは全て用いることができる。例えば、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属、等に属する微生物菌株の他、酵母菌

株等をあげることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主に於いて自立複製可能ないは染色体中への組込みが可能で、糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0026】

大腸菌等の微生物を宿主として用いる場合は、糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子の発現ベクターは微生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0027】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガー・マンハイム社より市販）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669-675(1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277(1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 82, 4306(1985)]、pBluescript II (STRATAGENE社)、pTrS30 [エシェリヒア・コリ JM109/pTrS30 (FERM BP-5407) より調製] および pTrS32 [エシェリヒア・コリ JM109/pTrS32 (FERM BP-5408) より調製]、pUC19 [Gene, 33, 103-119(1985)]、pSTV28（宝酒造社製）、pPA1（特開昭63-233798）等を例示することができる。

【0028】

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター (Plac)、P<sub>L</sub>プロモーター、P<sub>R</sub>プロモーターなどの、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター (Ptrpx2)、tacプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0029】

リボソーム結合配列としては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、リボソーム結合配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

#### 【0030】

宿主としては、組換え体DNAが発現でき、糖ヌクレオチドの生成反応に利用できるものならいかなる微生物も使用でき、具体的には、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli MP347、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium ammoniagenes ATCC21170、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium acetophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniophilum ATCC15354等をあげることができる。

#### 【0031】

酵母菌株を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp 13 (ATCC37115)、YEp 24 (ATCC37051)、Y Cp 50 (ATCC37419)等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母菌株の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$  1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

#### 【0032】

宿主としては、組換え体DNAが発現でき、糖ヌクレオチドの生成反応に利用できるものならいかなる微生物も使用でき、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Candida utilis、Candida parapsilosis、Candida krusei、Candida versatilis、Candida lipolytica、Candida zeylanoides、Candida guilliermondii、Candida albicans、Candida humicola、Pichia farinosa、Pichia ohmeri、Torulopsis candida、Torulopsis sphaerica、Torulopsis xylinus、Torulopsis famata、Torulopsis versatilis、Debaryomyces subglobosus、Debaryomyces cantarellii、Debaryomyces globosus、Debaryomyces hansenii、Debaryomyces japonicus、Zygosaccharomyces rouxii、Zygosaccharomyces bailii、Kluyveromyces lactis、Kluyveromyces marxianus、Hansenula anomala、Hansenula jadinii、Brettanomyces lambicus、Brettanomyces anomalus、Schizosaccharomyces pombe、Trichosporon pullulansおよびSchwanniomyces alluvius等をあげることができる。

## 【0033】

本発明に用いる微生物の培養は、通常の培養方法に従って行うことができる。

該微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該微生物の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、シュクロース、ラクトース、マルトース、マンニトール、ソルビトール、糖蜜、澱粉あるいは澱粉加水分解物等の炭水化物、ピルビン酸、乳酸、クエン酸、フマル酸などの各種有機酸、グルタミン酸、メチオニン、リジンなどの各種アミノ酸、エタノール、プロパノール、グリセロール等のアルコール類が用いられる。また、白糖、キャッサバ、バガス、コーン・スティープ・リカーなどの天然有機栄養源も用いることができる。

## 【0034】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩類、グルタミン酸、グルタミン、メチオニンなどのアミノ酸、ペ

プトン、NZアミン、コーン・ステープ・リカー、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕、大豆粕加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物などが用いられる。

【0035】

無機物としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、硫酸亜鉛、炭酸カルシウム等が用いられる。

ビタミン、アミノ酸、核酸等を必要に応じて添加してもよい。

【0036】

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～45℃がよく、培養時間は、通常5～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0037】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

【0038】

本発明の糖ヌクレオチドの製造において、2種以上の微生物を用いる場合、該微生物それぞれを個別に培養し、該培養液を利用して糖ヌクレオチドの製造に用いてもよいし、一つの培養器に同時に植菌し、混合培養した後、該培養液を利用して糖ヌクレオチドの製造に用いてもよい。また、いずれかの微生物の培養中もしくは培養終了時に残りの微生物を植菌し、培養した後、該培養液を利用して糖

ヌクレオチドの製造に用いてもよい。更に、上述1)に記載の性質を有する微生物と2)に記載の性質を有する微生物とを別々に培養し、各々の培養液を利用して糖ヌクレオチドの製造に用いてもよい。

【0039】

該培養により得られた微生物の培養液および該培養液を種々処理した培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中で糖ヌクレオチドの生成に用いることができる。

培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる細胞（菌体を含む）、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分画物、該細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品等を挙げることができる。

【0040】

糖ヌクレオチドの生成において用いられる酵素源の量は、湿菌体として、1～400 g/lであり、好ましくは5～300 g/lである。また、同時に2種以上の微生物を用いて水性媒体中で反応を行う場合には、水性媒体中の該微生物の全湿菌体量は2～500 g/lであり、好ましくは5～400 g/lである。

糖ヌクレオチドの生成において用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

【0041】

糖ヌクレオチドの生成において用いられるヌクレオチドの前駆物質としては、オロット酸、ウラシル、オロチジンおよびウリジン等をあげることができ、好ましくはオロット酸をあげることができる。該ヌクレオチドの前駆物質は、純品および該前駆物質の塩並びに夾雑物が反応を阻害しない限り、微生物により発酵生産された該前駆物質含有培養液および該培養液の該前駆物質粗精製物を用いることができる。ヌクレオチドの前駆物質は0.01～1.0 M、好ましくは0.0

1～0.3 Mの濃度で用いられる。

【0042】

糖ヌクレオチドの生成において用いられる糖としては、グルコース、ガラクトース、グルコサミンまたはN-アセチルグルコサミン等をあげることができる。該糖は、純品を用いてもよいし、これらを含むもので、夾雑物が反応を阻害しないものであればいずれも用いることができる。糖は0.01～1.0 Mの濃度で用いられる。

【0043】

糖ヌクレオチドの生成において、必要に応じて、ATP再生に必要なエネルギー供与体、補酵素、リン酸イオン、マグネシウムイオン、界面活性剤および有機溶剤を添加してもよい。

エネルギー供与体としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、ラクトース、マルトース、マンニトール、ソルビトールなどの炭水化物、ピルビン酸、乳酸、酢酸などの有機酸、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸などのアミノ酸、糖蜜、澱粉加水分解物等をあげることができ、0.02～2.0 Mの濃度で用いられる。

【0044】

補酵素としては、アセチルコエンザイムA、コエンザイムA、パントテン酸等をあげることができ、該補酵素は純品を用いてもよいし、これらを含むもので、夾雑物が反応を阻害しないものであればいずれも用いることができる。補酵素は0.01 mM～0.1 Mの濃度で用いられる。

リン酸イオンとしては、正リン酸、ピロリン酸、トリポリリン酸、テトラポリリン酸、テトラポリメタリン酸などのポリリン酸、ポリメタリン酸、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウムなどの無機リン酸塩等をあげることができ、0.01～1.0 Mの濃度で用いることができる。

【0045】

マグネシウムイオンとしては、硫酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、塩化マグネシウムなどの無機マグネシウム塩、クエン酸マグネシウムなどの有機マ

グネシウム塩などをあげることができ、通常1～20 mMの濃度で用いられる。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミンS-215、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・サルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミンFB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、各種糖ヌクレオチドの生成を促進するものであればいずれでも良く、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1～50 g/l、好ましくは1～20 g/lの濃度で用いられる。

#### 【0046】

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常0.1～50 ml/l、好ましくは1～20 ml/lの濃度で用いられる。

糖ヌクレオチドの生成反応は、水性媒体中、pH5～10、好ましくはpH6～8、20～50℃の条件で2～48時間行う。

#### 【0047】

該方法により糖ヌクレオチドが生成することができ、例えば、ウリジン二リン酸化合物等をあげることができる。具体的には、UDP-Glc、UDP-Gal、UDP-GlcNAc等をあげることができる。

水性媒体中に生成した糖ヌクレオチドの定量は公知の方法に準じて行うことができ、例えば、UDP-GlcとUDP-Galの分離定量はAnal. Biochem., 216, 188-194(1994)記載の高速液体クロマトグラム（以下、HPLCと略す）による方法で行うことができる。また、UDP-GlcNAcの分離定量は以下の条件のHPLCにより行うことができる。

#### 【0048】

溶出液：0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
           ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ を用いてpH3.2に調整)  
 流速　：1ml/min



カラム : Partisil-10 SAX (ワットマン社製)

検出 : UV 262 nm

定量 : スタンドアードの吸光度値の比較により算出

反応液中に生成した糖ヌクレオチドの精製は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法によって行うことができ(特開平8-23993)、例えば、UDP-GalおよびUDP-GlcにおいてはJ. Org. Chem., 57, 152(1992)、UDP-GlcNAcにおいてはJ. Org. Chem., 57, 146(1992)に記載の方法に準じて行うことができる。

【0049】

本発明の複合糖質の製造に用いることのできる微生物あるいは動物細胞としては、糖ヌクレオチドと複合糖質前駆体から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞であればいずれも用いることができ、例えば、 $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを産生するヒト・メラノーマ細胞WM266-4株(ATCC CRL1676)、およびヒト・メラノーマ細胞WM266-4由来 $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を含有するナマルバ細胞KJM-1株等の組換え株(特開平6-181759)、ヒト・メラノーマ細胞SK-Mel-28細胞由来のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現する大腸菌(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 4638(1996)、ヒトHela細胞由来の $\beta$ 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現する大腸菌(EMBO J., 9, 3171(1990))あるいはSaccharomyces cerevisiae[Biochem. Biophys. Res. Commun., 201, 160(1994)]、ラット由来の $\beta$ 1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝子を発現するCOS-7細胞(ATCC, CRL1651)[J. Biol. Chem., 268, 15381(1993)]等の動物細胞あるいは微生物をあげることができる。

【0050】

本発明の複合糖質の製造に微生物を用いる場合には、該微生物を、上記ヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養と同様の培地、培養条件により培養することができる。

本発明の複合糖質の製造に動物細胞を用いる場合には、該動物細胞を培養する培地として、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM

培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で行う。培養温度は35～37℃がよく、培養時間は、通常3～7日間である。また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0051】

該培養により得られた微生物あるは動物細胞の培養液および該培養液を種々処理した培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中で複合糖質の生成に用いることができる。

培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる細胞（菌体を含む）、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分画物、該細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品等を挙げることができる。

【0052】

複合糖質の生成において用いられる酵素源の量は、酵素の活性を、37℃、1分間に1  $\mu$ moleの複合糖質を生成することのできる活性を1単位（U）として、0.01U/1～100U/1であり、好ましくは0.1U/1～100U/1である。

糖ヌクレオチドの生成において用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

【0053】

複合糖質の生成において用いられる糖ヌクレオチドとしては、上記糖ヌクレオチドの生成で得られた反応液あるいは該反応液から精製した糖ヌクレオチドを用いることができ、1～100mM、好ましくは5～100mMの濃度で用いることができる。

複合糖質の生成において用いられる複合糖質前駆体としては、オリゴサッカラ

イド、蛋白質、ペプチド、糖蛋白質、糖脂質またはグリコペプチドを用いることができ、具体的にはN-アセチルグルコサミン、 $\text{GlcNAc } \beta 1\text{-}3\text{Gal } \beta 1\text{-}4\text{Glc}$ 等をあげることができる。糖複合糖質前駆体は0.1~100 mM、好ましくは0.5~50 mMの濃度で用いることができる。

【0054】

該方法により、種々の複合糖質を生成することが可能であり、例えば、ガラクトース含有複合糖質をあげることができる。更に具体的にはラクトーN-テトラオース、ラクトーN-ネオテトラオース、N-アセチルラクトサミン等をあげることができる。

複合糖質の生成において、必要に応じて、 $\text{MnCl}_2$ 等の無機塩、 $\beta$ -メルカプトエタノール等を添加することができる。

【0055】

水性媒体中に生成した複合糖質の定量は公知の方法に準じて行うことができる(特開平6-181759)。

反応液中に生成した複合糖質の採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法によって行うことができ(特開平8-23993)、例えば、N-アセチルラクトサミンにおいてはJ. Org. Chem., 47, 5416(1982)記載の方法に準じて行うことができる。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0056】

以下に本発明の実施例を示す。

【0057】

【実施例】

実施例1 galU、ppaを発現する組換え体プラスミドの造成：

galU、ppaを発現する組換え体プラスミドpNT12の造成方法について以下に述べる(図1、図2)。

1)  $P_L$  プロモーターを含む発現ベクターの造成

$P_L$  プロモーターを含む発現ベクターであるpPA31およびpPAC31は

以下に示す方法で造成した（図1）。

【0058】

トリプトファンプロモーターを含むプラスミド pTrS30 を保有するエシェリヒア・コリ JM109/pTrS30（FERM BP-5407）および  $P_L$  プロモーターを含むプラスミド pPA1（特開昭63-233798）、 $P_L$  プロモーターおよび cI857 リプレッサーを含むプラスミド pPAC1 を保有する大腸菌を、それぞれ LB 培地〔バクトトリプトン（ディフコ社製）10 g/l、酵母エキス（ディフコ社製）5 g/l、NaCl 5 g/l、pH を 7.2〕に植菌し、30℃、18 時間培養した。

【0059】

該培養により得られた菌体から前述の公知の方法により、pTrS30、pPA1 および pPAC1 プラスミド DNA を単離精製した。

精製した pTrS30 DNA 0.5  $\mu$ g を制限酵素 PstI および ClaI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II キット（Bio101 社製）により 3.4 kb の断片を回収した。

精製した pPA1 DNA 1  $\mu$ g を制限酵素 PstI および ClaI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 1.0 kb の断片を回収した。

【0060】

該 3.4 kb の断片および 1.0 kb の断片をライゲーションキット（TAKARA ligation Kit、宝酒造社製）を用いて、16℃、16 時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いて大腸菌 NM522 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

【0061】

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、 $P_L$  プロモーターによる発現ベクターである pPA31 を得た。

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第1図）。

精製した pPA31 DNA 0.5  $\mu$ g を制限酵素 PstI および ClaI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II キットにより 3.4 kb の断片を回収した。

【0062】

精製した pPAC1 DNA 1  $\mu$ g を制限酵素 PstI および ClaI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 2.3 kb の断片を回収した。

該 3.4 kb の断片および 2.3 kb の断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。

【0063】

該連結反応液を用いて大腸菌 NM522 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、cI857 リプレッサーを含む  $P_L$  プロモーターによる発現ベクターである pPAC31 を取得した。

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第1図）。

【0064】

## 2) galU 発現プラスミドの造成

大腸菌 W3110 株の染色体 DNA を公知の方法 [例えば Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc.(1994)] により単離精製した。

配列番号1記載のセンス鎖 DNA プライマーと、配列番号2記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーをアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製 380A・DNA 合成機を用いて合成した。

【0065】

該合成 DNA をプライマーとして、W3110 株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。

PCR は W3110 染色体 DNA 0.1  $\mu$ g、プライマー各 0.5  $\mu$ M、P

f u DNAポリメラーゼ (STRATAGENE社製) 2.5 units、Pfu DNAポリメラーゼ用 x10 緩衝液 (STRATAGENE社製) 4  $\mu$ l、deoxyNTP各 200  $\mu$ Mを含む反応液 40  $\mu$ lを用い、94℃-1分、42℃-2分、72℃-3分の工程を30回繰り返すことにより行った。

【0066】

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動にかけ、目的の断片が増幅されていることを確認後、残りの反応液と等量のTE (10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA) 飽和フェノール/クロロホルム (1 v o 1/1 v o 1) を添加し、混合した。

該混合液を遠心分離後、得られた上層に2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80℃に30分放置した。

【0067】

該放置液を遠心分離しDNAの沈殿を得た。

該沈殿を70%冷エタノールで洗浄し、真空乾燥して沈殿を得た。以後、TE 飽和フェノール/クロロホルムを添加し、エタノールで洗浄したDNAの沈殿を得るまでの操作をエタノール沈殿法と呼ぶ。

該DNAの沈殿を20  $\mu$ lのTEに溶解した。

【0068】

該溶解液5  $\mu$ lを用い、DNAを制限酵素HindIIIおよびBamHIで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットにより940bpの断片を回収した。

実施例1-1)で取得したpPA31 DNA 0.5  $\mu$ gを制限酵素HindIIIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に4.2kbの断片を回収した。

【0069】

該940bpの断片および4.2kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いて大腸菌MP347株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50  $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後

、30℃で一晩培養した。

【0070】

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、galU発現プラスミドであるpNT9を得た。

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第2図）。

【0071】

3) galU, ppa同時発現プラスミドの造成

配列番号3記載のセンス鎖DNAプライマーと、配列番号4記載のアンチセンス鎖DNAプライマーを合成し、該合成DNAをプライマーとして、W3110株の染色体DNAを鋳型として前述と同一の条件でPCRを行った。

PCR終了後、エタノール沈殿法により、DNAの沈殿を取得した。

【0072】

該沈殿を20μlのTEに溶解した。

該溶解液5μlを用い、DNAを制限酵素BamHIおよびSalIで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットにより1.0kbの断片を回収した。

実施例1-2)で取得したpNT9 DNA 0.5μgを制限酵素BamHIおよびSalIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に4.9kbの断片を回収した。

【0073】

該1.0kbの断片および4.9kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いて大腸菌MP347株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50μg/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

【0074】

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、galU, ppa同時発現プラスミドであるpNT12を得た。

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第2図）。

【0075】

実施例2. UDP-Glcの生産

実施例1で得た大腸菌MP347/pNT12株を、アンピシリン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB培地 $125\text{ml}$ の入った $1\text{L}$ 容バッフル付き三角フラスコに接種し、 $30^\circ\text{C}$ 、 $220\text{rpm}$ の条件で $17$ 時間培養した。

該培養液 $125\text{ml}$ をグルコース  $10\text{g}/\text{l}$ 、バクトトリプトン（ディフコ社製）  $12\text{g}/\text{l}$ 、酵母エキス（ディフコ社製）  $24\text{g}/\text{l}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $2.3/\text{l}$ （別殺菌）、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $12.5\text{g}/\text{l}$ （別殺菌）、アンピシリン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の組成からなる液体培地（pH無調整） $2.5\text{L}$ の入った $5\text{L}$ 容培養槽に接種し、 $30^\circ\text{C}$ で $4$ 時間、更に、 $40^\circ\text{C}$ で $3$ 時間、 $600\text{rpm}$ 、通気量 $2.5\text{L}/\text{分}$ の条件で培養を行った。

【0076】

該培養中、 $28\%$ アンモニア水を用いて、培養液のpHを $7.0$ に維持した。また、培養途中で必要に応じてグルコースを $5\text{g}/\text{l}$ から $30\text{g}/\text{l}$ 添加した。

該培養液を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて $-20^\circ\text{C}$ で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21170株を、グルコース  $50\text{g}/\text{l}$ 、ポリペプトン（日本製薬社製）  $10\text{g}/\text{l}$ 、酵母エキス（オリエンタル酵母社製）  $10\text{g}/\text{l}$ 、尿素  $5\text{g}/\text{l}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $5\text{g}/\text{l}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1\text{g}/\text{l}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $3\text{g}/\text{l}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $1\text{g}/\text{l}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $0.1\text{g}/\text{l}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $10\text{mg}/\text{l}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $10\text{mg}/\text{l}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim6\text{H}_2\text{O}$   $20\text{mg}/\text{l}$ 、L-システイン  $20\text{mg}/\text{l}$ 、D-パントテン酸カルシウム  $10\text{mg}/\text{l}$ 、ビタミンB1  $5\text{mg}/\text{l}$ 、ニコチン酸  $5\text{mg}/\text{l}$ 、およびビオチン  $30\mu\text{g}/\text{l}$ （ $10\text{N NaOH}$ でpH $7.2$ に調整）の組成からなる液体培地 $20\text{ml}$ の入った $300\text{ml}$ 容バッフル付き三角フラスコに接種し、 $28^\circ\text{C}$ 、 $220\text{rpm}$ の条件で、 $24$ 時間培養した。

【0077】

該培養液 $20\text{ml}$ を上記と同一組成の液体培地 $240\text{ml}$ の入った $2\text{L}$ 容バッ



フル付き三角フラスコに接種し、28℃、220rpmの条件で、24時間培養した。得られた培養液を種培養液として用いた。

該種培養液250mlを、グルコース 150g/l、肉エキス（極東製薬社製） 5g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10g/l、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10g/l、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  20mg/l（別殺菌）、 $\beta$ -アラニン 15mg/l（別殺菌）、L-システイン 20mg/l、ビオチン 100 $\mu\text{g}$ /l、尿素 2g/l、およびビタミンB1 5mg/l（別殺菌）（10N NaOHでpH 7.2に調整）の組成からなる液体培地2.5Lの入った5L容培養槽に接種し、32℃、600rpm、通気量2.5L/minの条件で24時間培養を行った。

【0078】

培養中、28%アンモニア水を用いて、培養液のpHを6.8（ $\pm 0.1$ ）に維持した。

該培養液を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

大腸菌MP347/pNT12株湿菌体 40g/l、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21170株湿菌体 150g/l、グルコース 100g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5g/l、フィチン酸 5g/l、オロット酸（カリウム塩） 21.2g/l、ナイミーンS-215 4g/l、キシレン 10ml/lの組成からなる反応液30mlを200ml容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900rpm）し、21時間反応を行った。

【0079】

反応中、4N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持した。

該反応により、反応液中に43.9g/lのUDP-Glc（2Na塩）が生成した。

【0080】

実施例3. galT、galKを発現する組換え体プラスミドの造成:

galT、galKを発現する組換え体プラスミドpNT25の造成方法について以下に述べる(第3図)。

配列番号5記載のセンス鎖DNAプライマーと、配列番号6記載のアンチセンス鎖DNAプライマーを合成し、該合成DNAをプライマーとして、W3110株の染色体DNAを鋳型として前述と同一の条件でPCRを行った。

【0081】

PCR終了後、エタノール沈殿法によりDNAの沈殿を取得した。

該DNA沈殿を20 $\mu$ lのTEに溶解した。

該溶解液5 $\mu$ lを用い、DNAを制限酵素HindIIIおよびHincIIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットにより2.0kbの断片を回収した。

【0082】

pBluescriptII SK+ DNA 0.5 $\mu$ gを制限酵素HindIIIおよびEcoRVで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に3.0kbの断片を回収した。

該2.0kbの断片および3.0kbの断片をライゲーションキットを用いて、16 $^{\circ}$ C、16時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いて大腸菌NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。

【0083】

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、galT、galK遺伝子を含むプラスミドであるpNT19を得た。

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第3図)。

該pNT19 DNA 0.5 $\mu$ gを制限酵素ClaIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に2.0kbの断片を回収した。

【0084】

実施例1-1)で取得したpPAC31 DNA 0.2  $\mu$ gを制限酵素C1a IおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.5 kbの断片を回収した。

該2.0 kbの断片および5.5 kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。

【0085】

該連結反応液を用いて大腸菌MP347株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50  $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、galT、galK同時発現プラスミドであるpNT25を得た。

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第3図)。

【0086】

実施例4. UDP-Galの生産

実施例1で得た大腸菌MP347/pNT12株および実施例3で得た大腸菌MP347/pNT25株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

【0087】

実施例2と同様の方法により、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21170株の湿菌体を取得した。

大腸菌MP347/pNT12株湿菌体 25 g/l、大腸菌MP347/pNT25株湿菌体 50 g/l、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21170株湿菌体 150 g/l、グルコース 80 g/l、ガラクトース 20 g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 g/l、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、オロット酸(カリウム塩) 10.6 g/l、ナイミーンS-2 15.4 g/lの組成からなる反応液30 mlを200 ml容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌(900 rpm)し、22時間

反応を行った。

【0088】

反応中、4N NaOHを用いて、該反応液のpH7.2に維持し、必要に応じて、グルコース、ガラクトース、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ を添加した。

該反応により、反応液中に17.2g/lのUDP-Gal(2Na塩)が生成した。

【0089】

実施例5. glmU、ppa、pgm、ackA、pta、glmM発現プラスミドの造成

1) glmU、ppa発現プラスミドの造成

配列番号7記載のセンス鎖DNAプライマーと、配列番号8記載のアンチセンス鎖DNAプライマーを合成した。該合成DNAをプライマーとして、W3110株の染色体DNAを鋳型として前述と同一の条件でPCRを行った。

【0090】

PCR終了後、エタノール沈殿法によりDNAの沈殿を取得した。

該DNA沈殿を20μlのTEに溶解した。

該溶解液5μlを用い、DNAを制限酵素HindIIIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキットにより1.4kbの断片を回収した。

【0091】

実施例1-1)で取得したpPA31 DNA0.5μgを制限酵素HindIIIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に4.2kbの断片を回収した。

該1.4kbの断片および4.2kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。

【0092】

該連結反応液を用いて大腸菌MP347株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50μg/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、 $glmU$ 発現プラスミドである $pNT10$ を得た。

【0093】

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第4図）。

実施例1-3）で取得した $pNT12$  DNA  $0.5 \mu g$ を制限酵素BamHIおよびSalIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に $1.0 kb$ の断片を回収した。

上記 $pNT10$  DNA  $0.2 \mu g$ を制限酵素BamHIおよびSalIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に $5.3 kb$ の断片を回収した。

【0094】

該 $1.0 kb$ の断片および $5.3 kb$ の断片をライゲーションキットを用いて、 $16^{\circ}C$ 、 $16$ 時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いて大腸菌MP347株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン $50 \mu g/ml$ を含むLB寒天培地に塗布後、 $30^{\circ}C$ で一晩培養した。

【0095】

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、 $glmU$ 、 $ppa$ 同時発現プラスミドである $pNT14$ を得た。

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第4図）。

【0096】

2)  $pgm$ 発現プラスミドの造成

配列番号9記載のセンス鎖DNAプライマーと、配列番号10記載のアンチセンス鎖DNAプライマーを合成した。該合成DNAをプライマーとして、W3110株の染色体DNAを鋳型として前述と同一の条件でPCRを行った。

PCR終了後、エタノール沈殿法により、DNAの沈殿を取得した。

【0097】

該沈殿を $20 \mu l$ のTEに溶解した。

該溶解液 $5 \mu l$ を用い、DNAを制限酵素ClaiおよびBamHIで切断後

、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に1.7 kbの断片を回収した。

実施例1-1)で取得したpPAC31 DNA 0.5  $\mu$ gを制限酵素C1a IおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.5 kbの断片を回収した。

【0098】

該1.7 kbの断片および5.5 kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いて大腸菌MP347株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50  $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

【0099】

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、pgm発現プラスミドであるpNT24を得た。

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第5図)。

【0100】

### 3) glmM発現プラスミドの造成

配列番号11記載のセンス鎖DNAプライマーと、配列番号12記載のアンチセンス鎖DNAプライマーを合成した。該合成DNAをプライマーとして、W3110株の染色体DNAを鋳型として前述と同一の条件でPCRを行った。

PCR終了後、エタノール沈殿法により、DNAの沈殿を取得した。

【0101】

該沈殿を20  $\mu$ lのTEに溶解した。

該溶解液5  $\mu$ lを用い、DNAを制限酵素HindIIIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキットにより1.4 kbの断片を回収した。

実施例1-1)で取得したpPA31 DNA 0.5  $\mu$ gを制限酵素HindIIIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に4.2 kbの断片を回収した。

【0102】

該1.4 kbの断片および4.2 kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いて大腸菌MP347株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50  $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

【0103】

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、glmM発現プラスミドであるpNT29（第6図）を得た。

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した。

該pNT29 DNA 0.5  $\mu$ gを制限酵素C1a IおよびBamH Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に1.4 kbの断片を回収した。

【0104】

実施例1-1)で取得したpPAC31 DNA 0.2  $\mu$ gを制限酵素C1a IおよびBamH Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.5 kbの断片を回収した。

該1.4 kbの断片および5.5 kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。

【0105】

該連結反応液を用いて大腸菌MP347株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50  $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、glmM発現プラスミドであるpNT31を得た。

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第6図）。

【0106】

4) ackA、pta発現プラスミドの造成

ackA、pta遺伝子を含む大腸菌染色体DNA断片を有する $\lambda$ ファージで

あるE9C9(405)(国立遺伝学研究所)を用い、QIAGEN Lambda Kit(QIAGEN社製)によりDNAを調製した。

得られたDNAを制限酵素Sph IおよびSma Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキットにより5.1 kbの断片を回収した。

【0107】

pPAC1 DNA 0.5  $\mu$ gを制限酵素Sph IおよびNru Iで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に4.9 kbの断片を回収した。

該5.1 kbの断片および4.9 kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。

【0108】

該連結反応液を用いて大腸菌MP347株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50  $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、ackA、pta発現プラスミドであるpNT26(第7図)を得た。

該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した。

【0109】

実施例6. UDP-GlcNAcの生産

実施例5で得た大腸菌MP347/pNT14株、MP347/pNT24株、MP347/pNT31株、MP347/pNT26株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

【0110】

実施例2と同様の方法により、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21170株の湿菌体を取得した。



大腸菌MP347/pNT14株湿菌体 25g/l、MP347/pNT24株湿菌体 25g/l、MP347/pNT26株湿菌体 25g/l、MP347/pNT31株湿菌体 25g/l、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21170株湿菌体 150g/l、グルコース 80g/l、グルコサミン塩酸塩 20g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5g/l、フィチン酸 5g/l、オロット酸（カリウム塩）10.6g/l、酢酸ナトリウム（3水和物）6.8g/l、コエンザイムA 6mg/l、ナイミーンS-215 4g/lの組成からなる反応液30mlを200ml容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900rpm）し、10時間反応を行った。

【0111】

反応中、4N NaOHを用いて、該反応液のpH7.2に維持し、必要に応じて、グルコース、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ を添加した。

該反応により、反応液中に1.0g/lのUDP-GlcNAc（2Na塩）が生成した。

【0112】

実施例7.  $\beta$ 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼの調製

プロテインAのIgG結合領域と $\beta$ 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼとの融合蛋白質をコードしている遺伝子を含むプラスミドpAMoERSAW1（特開平6-181759）で形質転換したナマルバKJM-1株をG418（ギブコ社製）を0.5mg/ml含むRPMI640・ITPSGF培地30mlに $5 \times 10^4$  cells/mlになるように懸濁し、 $\text{CO}_2$  インキュベーター中で、37℃、8日間培養した。

【0113】

該培養液から遠心分離により細胞を除き上清を回収した。該上清は、必要に応じて-80℃で保存可能であり、使用前に解凍して使用することができる。

該プロテインAのIgG結合領域と $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼとの融合蛋白質の生成された培養上清にアジ化ナトリウムを最終濃度0.1%になるように添加した後、製品説明書に従って前処理したIgGセファロース（ファ

ルマシア社製)を50  $\mu$ l添加し、4℃で一晩緩やかに攪拌した。

【0114】

攪拌後、遠心分離により $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの結合したIgGセファロースを回収し、RPMI 640・ITPSGF培地1mlで3回洗浄後、該IgGセファロースを $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの酵素源として用いた。

【0115】

#### 実施例8. ラクトーN-テトラオースの生産

ラクトーN-ネオテトラオース(オックスフォード・グライコシステムズ社製)を公知の方法により[Agric. Biol. Chem., 54, 2169(1990)]に従ってアミノピリジンにより蛍光標識した後、100 unitの $\beta$ -ガラクトシダーゼ(生化学工業社製)を加えて37℃で16時間反応させ、非還元末端のガラクトースを除去した。

【0116】

該反応液を、5分間、100℃で加熱し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを失活させた。

該反応により得られたGlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glcを複合糖質前駆体として用いた。

該複合糖質前駆体 0.5 mM、実施例7で取得したIgGセファロース結合 $\beta$ 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ 0.5 U、実施例4で取得したUDP-Galを含む反応液6  $\mu$ l (5 mM)、Tris-HCl (pH 7.9) 100 mM、MnCl<sub>2</sub> 10 mM、 $\beta$ -メルカプトエタノール 2 mMを含有する反応液36  $\mu$ lを、32℃で65時間放置し、反応を行った。

【0117】

反応終了後、該反応液に蓄積された生成物を下記条件でHPLCを用いて定量した。

カラム: TSKgel ODS-80TMカラム(4.6mmx30cm, TOSOH社製)

液相: 0.02 M酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0)

温度: 50℃

流速 : 1 ml/min

検出 : 蛍光検出器 (励起波長 320 nm、放射波長 400 nm)。

【0118】

生成物の同定はアミノピリジンで標識したラクト-N-テトラオースと標識された生成物の溶出時間を比較することにより行った。

該反応により、0.17 mM (0.12 g/l) のラクト-N-テトラオースが生成した。

【0119】

実施例 9. ラクト-N-ネオテトラオースの生産

実施例 8 で調製した複合糖質前駆体  $\text{GlcNAc } \beta 1-3\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$  0.5 mM、 $\beta 1, 4$ -ガラクトシルトランスフェラーゼ (シグマ社製) 0.5 mM、 $\beta 1, 4$ -ガラクトシルトランスフェラーゼ (シグマ社製) 0.5 U、実施例 4 で取得した  $\text{UDP-Gal}$  を含む反応液 6  $\mu\text{l}$  (5 mM)、 $\text{Tris-HCl}$  (pH 7.9) 100 mM、 $\text{MnCl}_2$  10 mM、 $\beta$ -メルカプトエタノール 2 mM、 $\alpha$ -ラクトアルブミン 0.2 mg/ml を含有する反応液 36  $\mu\text{l}$  を、32℃で65時間放置し、反応を行った。

反応終了後、該反応液に蓄積された生成物を実施例 8 と同様の条件で、HPLCを用いて定量した。なお、生成物の同定はアミノピリジンで標識したラクト-N-ネオテトラオースと生成物の溶出時間を比較することにより行った。

該反応により、0.15 mM (0.11 g/l) のラクト-N-ネオテトラオースが生成した。

【発明の効果】

本発明により、ヌクレオチドの前駆物質および糖から糖ヌクレオチドを、該糖ヌクレオチドおよび複合糖質前駆体から複合糖質を工業的に効率よく製造できる。

【0120】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

GGAGAAAGCT TATGGCTGCC ATTAATACGA A 31

【0121】

配列番号：2

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

AACACGGATC CGGATGTTAC TTCTTAATGC 30

【0122】

配列番号：3

配列の長さ：28

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

ATGGAGGATC CTGCTCTGTA TACCGTCT 28

【0123】

配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TGCTGGTCGA CCTGCGCTTG

【0124】

20

配列番号：5

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

AAGGAAAGCT TATGACGCAA TTTAATCCCG T

【0125】

31

配列番号：6

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

GCAAAGTTAA CAGTCGGTAC

【0126】

20

配列番号：7

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TCAGGAAGCT TATGTTGAAT AATGCTATGA G

【0127】

31

配列番号：8

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TCTCCGGATC CCATGTGACC GGGTTAG

27

【0128】

配列番号：9

配列の長さ：28

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TCTAAATCGA TGCAGACAAA GGACAAAG

28

【0129】

配列番号：10

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

TTGCAGGATC CTCGTAGGCC TGATAAG

27

【0130】

配列番号：11

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

AAACAAAGCT TATGAGTAAT CGTAAAT

27

【0131】

配列番号：12

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

ACAGCGGATC CGATGTGTTC GCTGAG

26

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は発現プラスミド pPA31 および pPAC31 の造成工程を示す。

【図2】

図2は galU、ppa 遺伝子発現プラスミド pNT9 および pNT12 の造成工程を示す

【図3】

図3は galT、galK 遺伝子発現プラスミド pNT25 の造成工程を示す

。

【図4】

図4は glmU、ppa 遺伝子発現プラスミド pNT14 の造成工程を示す。

【図5】

図5は pgm 遺伝子発現プラスミド pNT24 の造成工程を示す。

【図6】

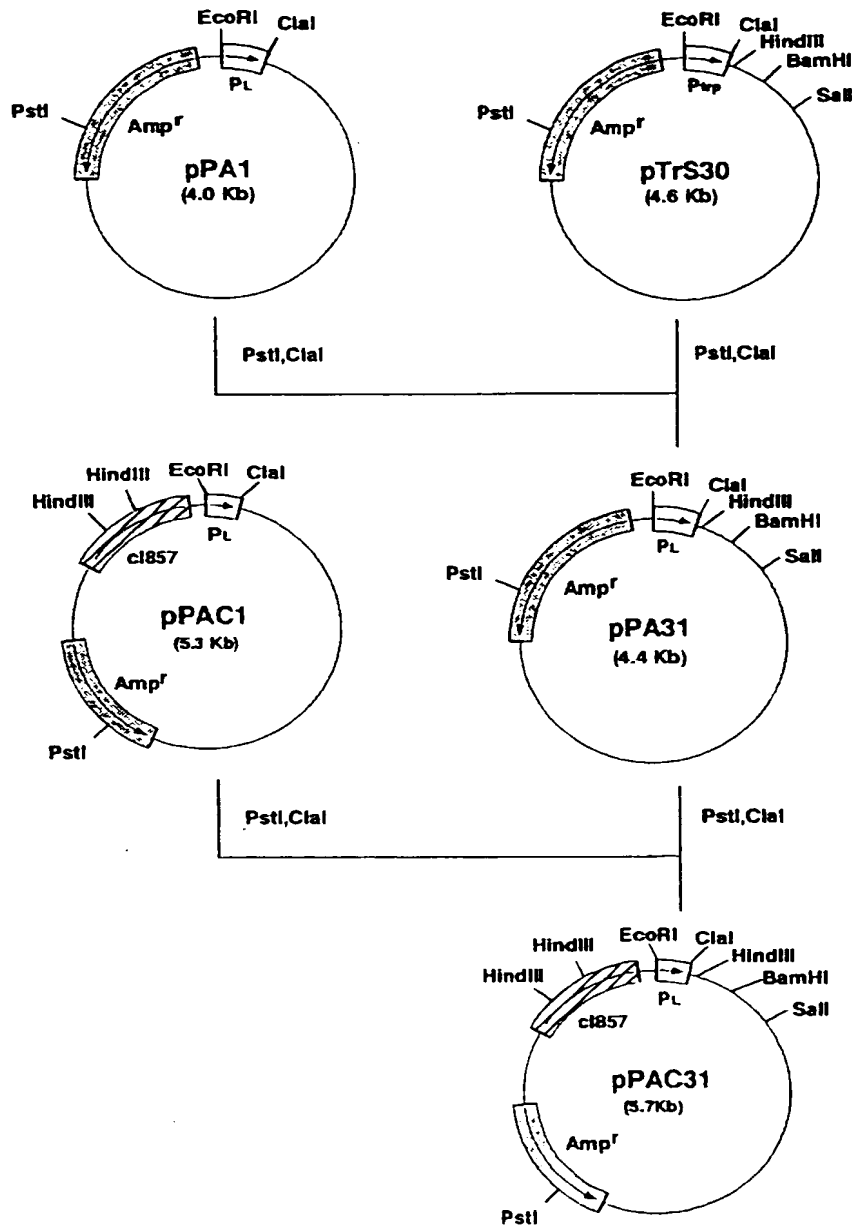
図6は glmM 遺伝子発現プラスミド pNT31 の造成工程を示す。

【図7】

図7は ackA、pta 遺伝子発現プラスミド pNT26 の造成工程を示す。

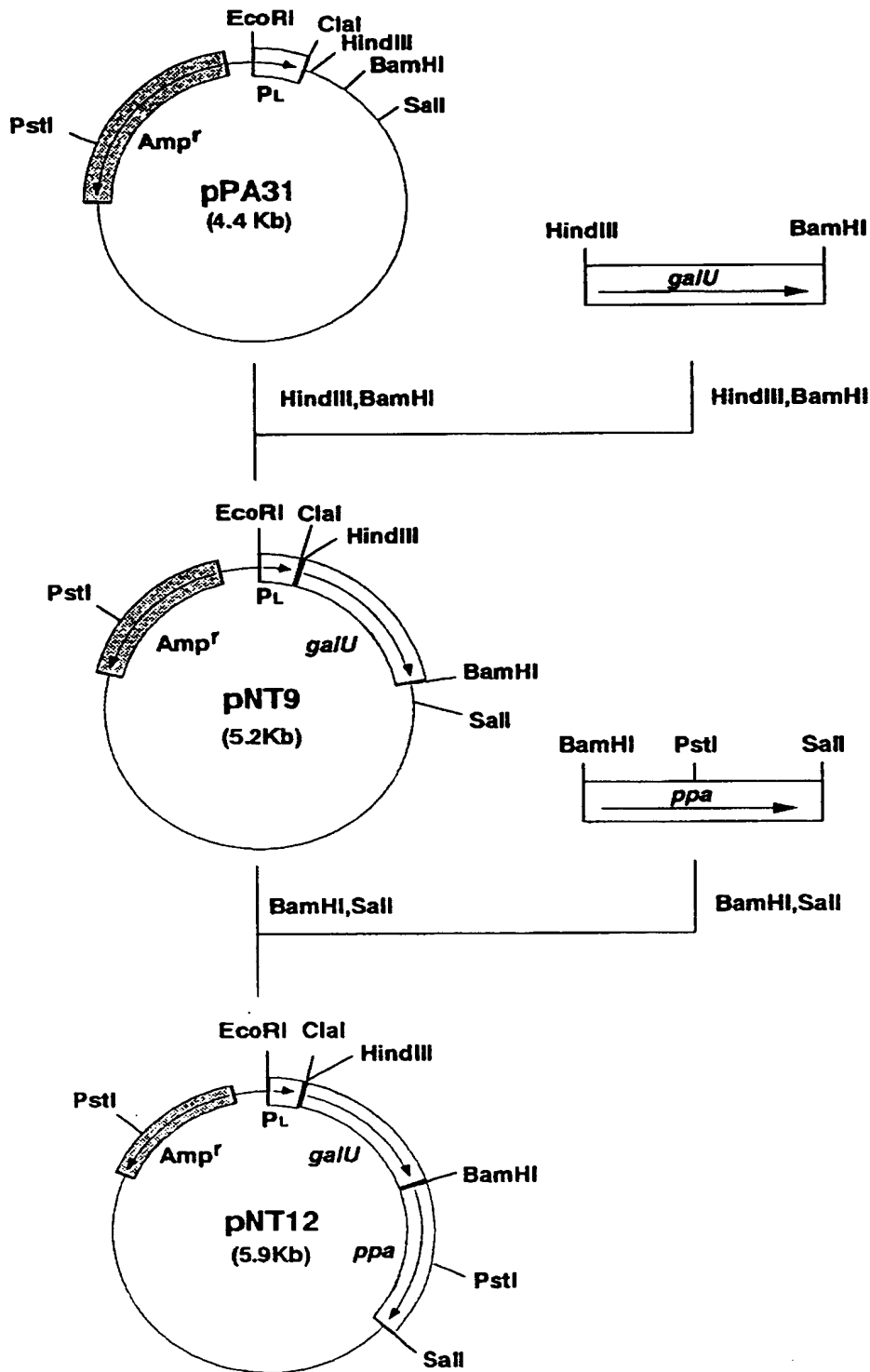
【書類名】 図面

【図1】

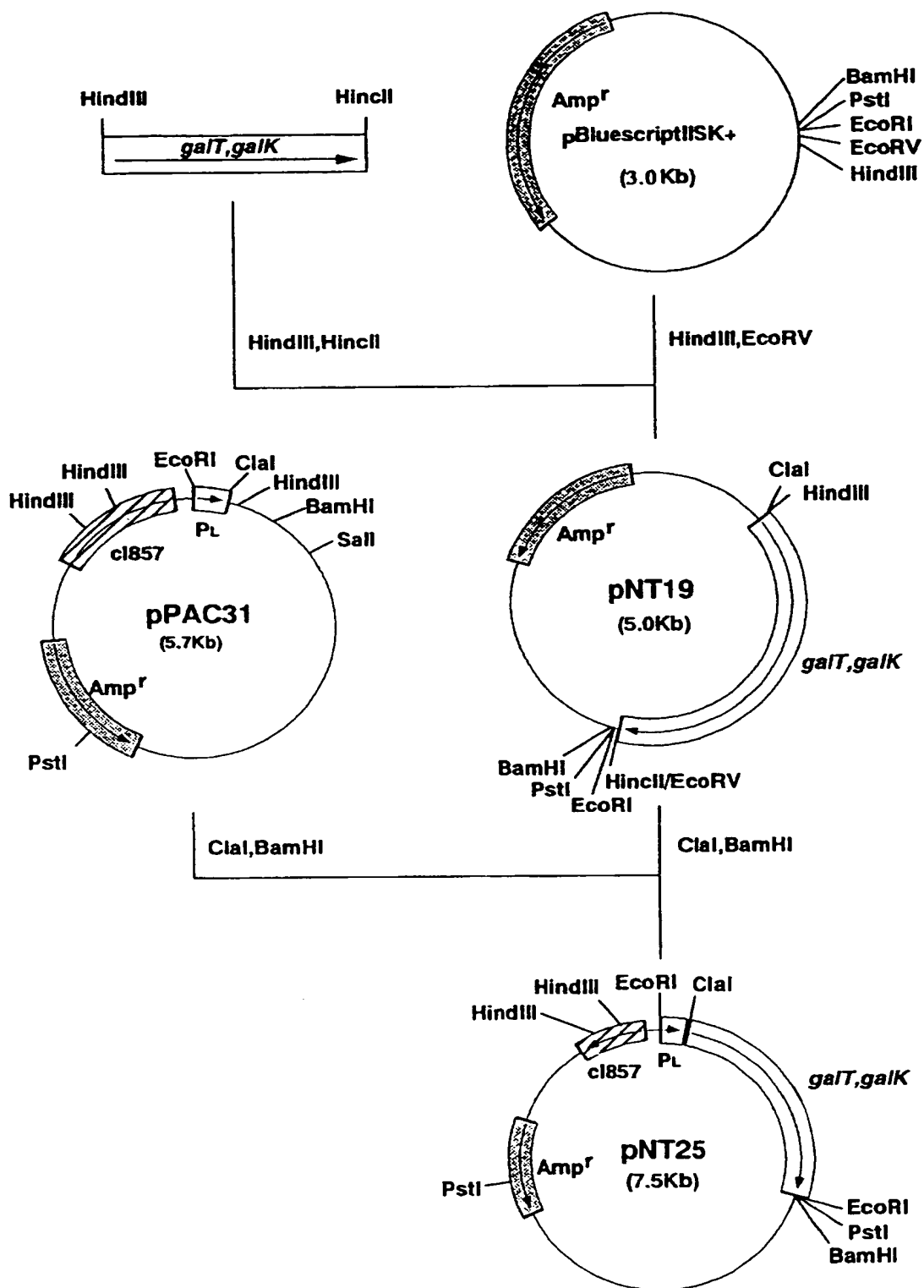




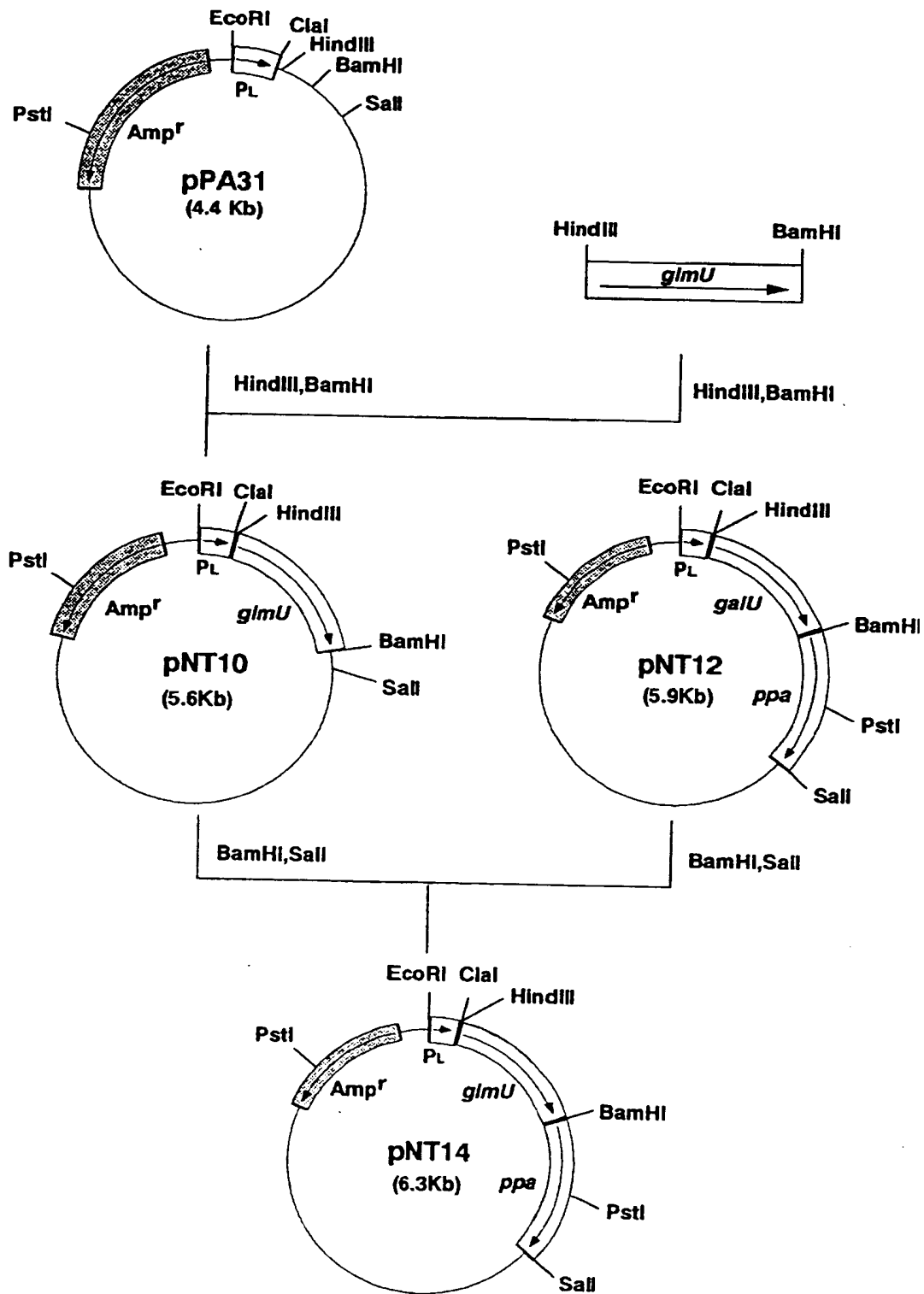
【図2】



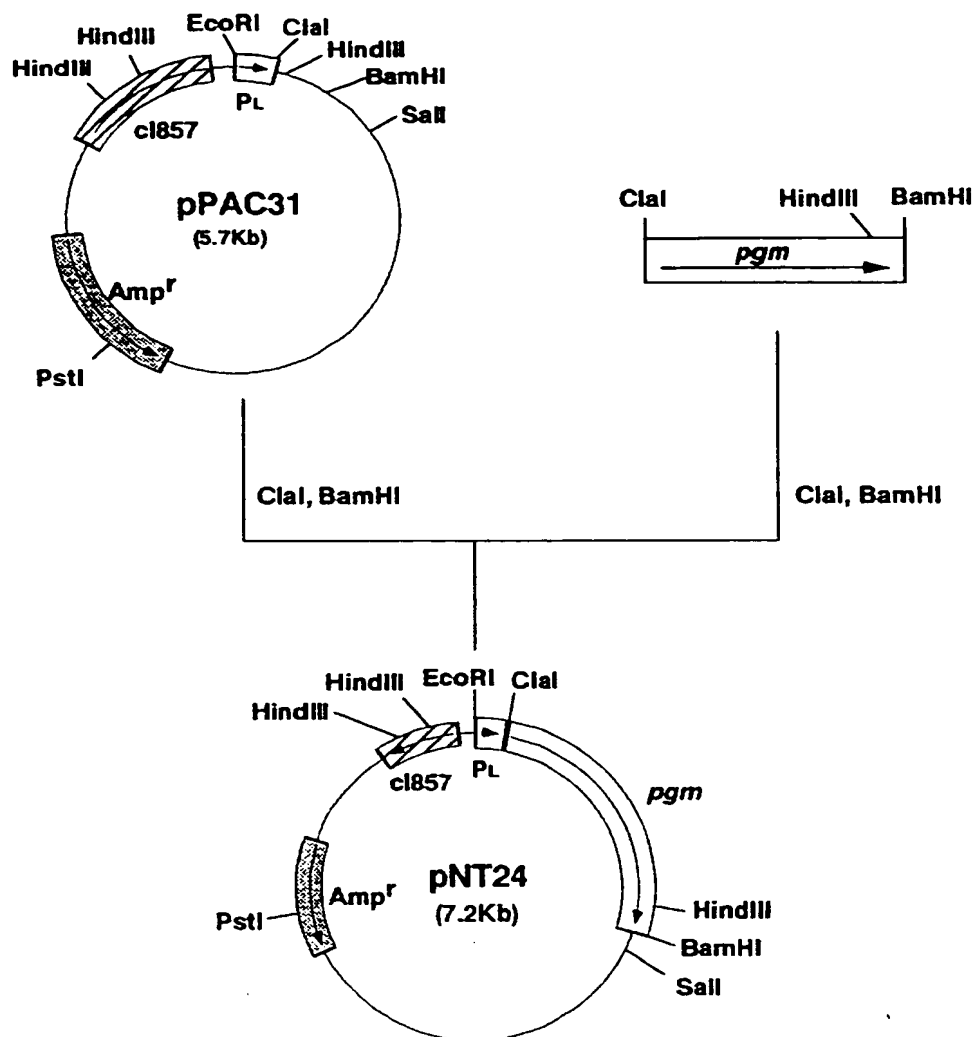
【図 3】



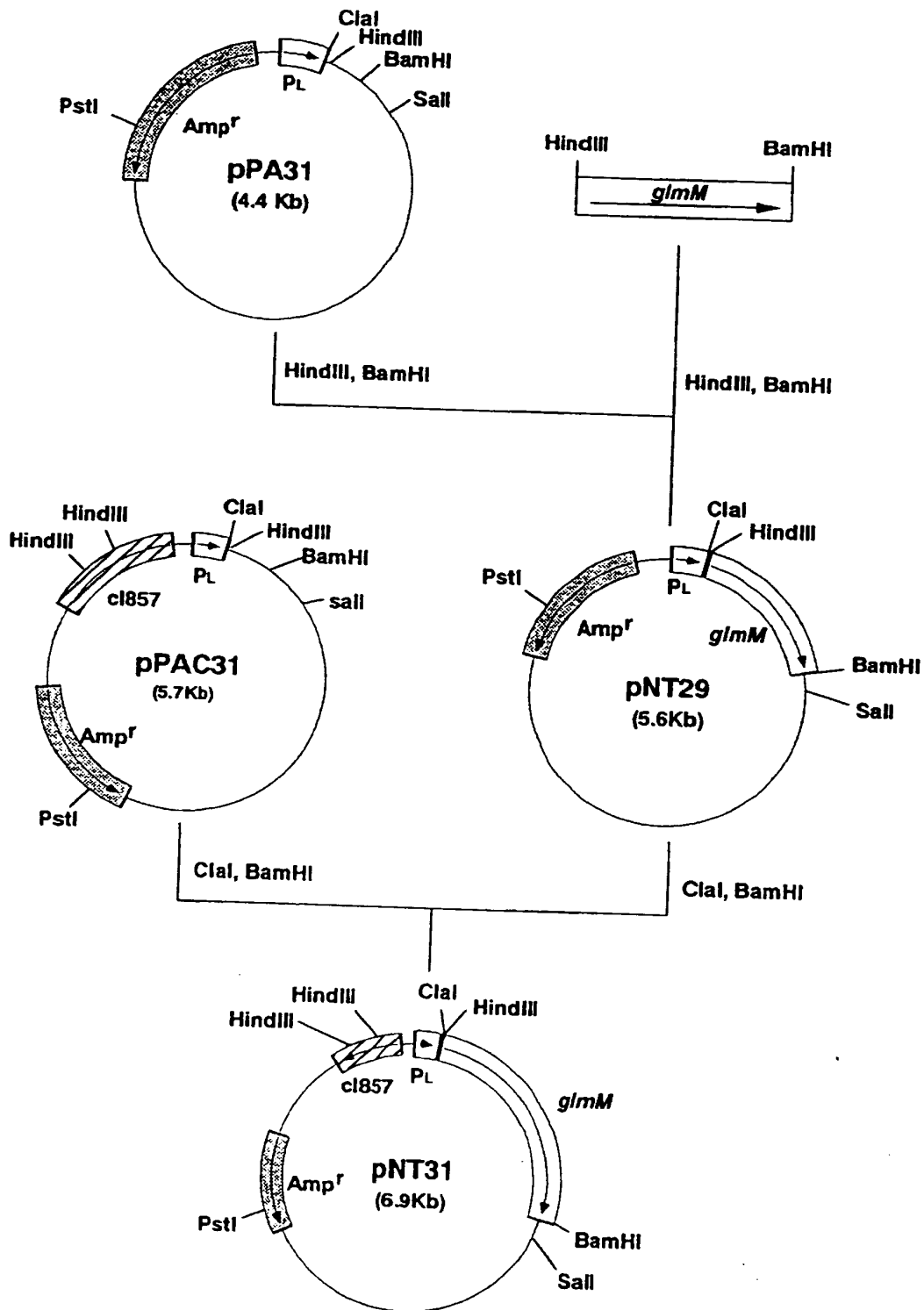
【図4】



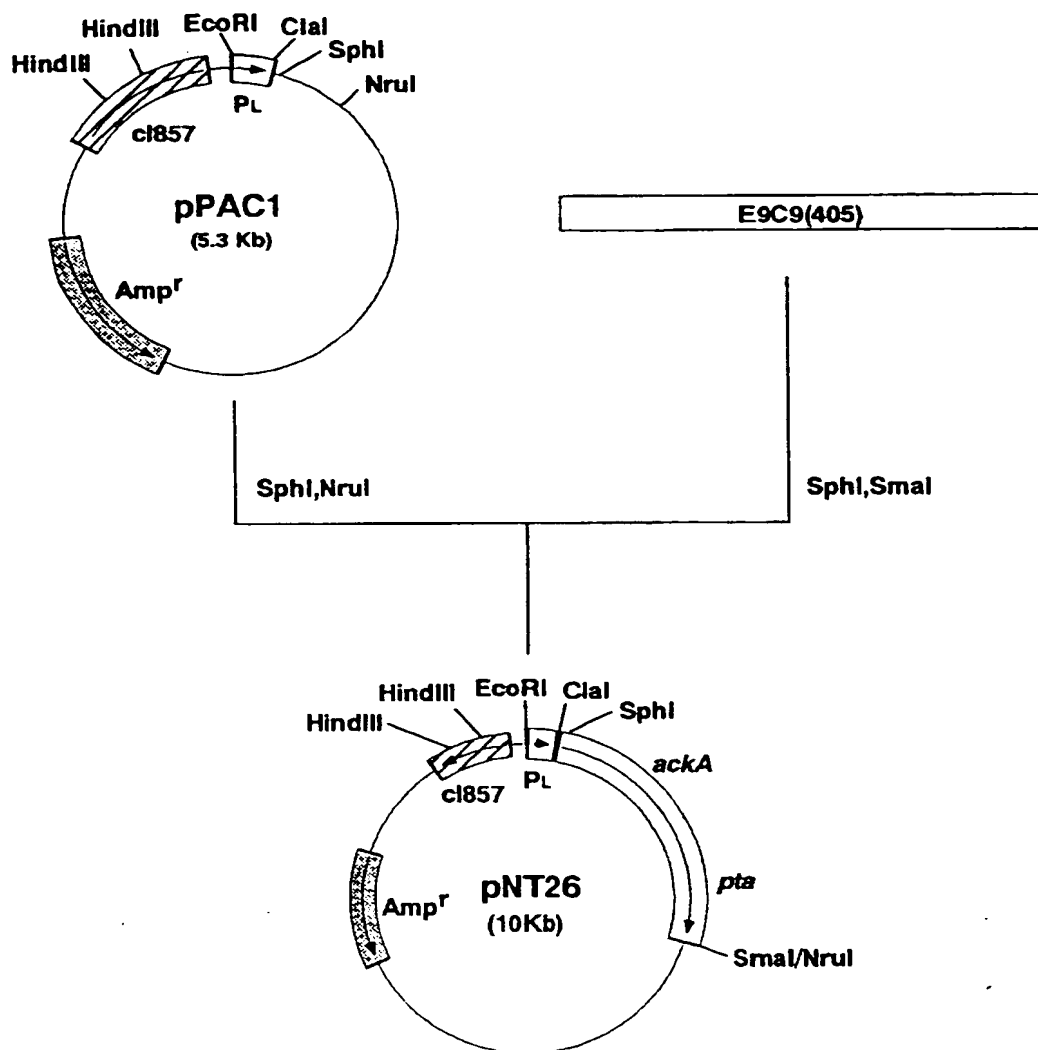
【図5】



【図6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細菌・ウイルス等の感染防御、心血管障害への適応および免疫治療として有用な糖鎖および該糖鎖の合成基質として重要である糖ヌクレオチドを工業的に有利に製造するための方法を提供することにある。

【解決手段】 ヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ヌクレオチドの前駆物質および糖を含む水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に糖ヌクレオチドを生成蓄積させ、該水性媒体から糖ヌクレオチドを採取することを特徴とする糖ヌクレオチドの製造法、およびヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、および糖ヌクレオチドと糖鎖基質から糖鎖を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ヌクレオチドの前駆物質、糖および糖鎖基質を含有する水性媒体中で酵素反応を行い、該水性媒体中に糖鎖を生成蓄積させ、該水性媒体中から糖鎖を採取することを特徴とする糖鎖の製造方法を提供することができる。

【選択図】 なし

特平 8-285066

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】 申請人  
【識別番号】 000001029  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町1丁目6番1号  
【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号  
氏 名 協和醗酵工業株式会社

